

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.12.007

• 基础研究 •

干扰肿瘤微环境对细胞毒性T淋巴细胞瘤体内归巢和杀伤活性的影响

徐伟立, 蔡建辉, 李索林, 问明, 温军业

Effect of Interfering Tumor Microenvironment on Homing and Killing Activity of Cytotoxic T Lymphocytes

XU Weili, CAI Jianhui, LI Suolin, WEN Ming, WEN Junye

Department of Pediatric Surgery, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China



Abstract: Objective To explore the effect of interfering tumor microenvironment with low-dose cyclophosphamide (CYC) administration on homing and killing activity of adoptive transfused cytotoxic T lymphocytes in adoptive immunotherapy. **Methods** Melanoma-bearing mice models were established and randomly divided into four groups: control group, CYC injection group (CYCI), the solution of 0.9% w/v of NaCl injection plus CTL infusion group (NSI+CTL) and CYC injection plus CTL infusion group (CYCI+CTL), 40 cases in each group. CYC (20 mg/kg) were intraperitoneally injected in mice of CYCI group and CYCI+CTL group. The same amount of the solution of 0.9% w/v of NaCl was injected in mice of NSI+CTL group. The levels of Treg, TGF- β and IL-10 were detected at the different time points before and after CYC or the solution of 0.9% w/v of NaCl injection. The cultured CFSE-CTLs were transfused at the 4th day after injection, 5×10^6 cells per mouse. Then, CFSE-CTLs ratio was analyzed by FCM. **Results** In NSI+CTL group, the levels of Treg, TGF- β and IL-10 were all increased continuously with tumor growth. CFSE-CTLs ratio in CYCI+CTL group was significantly higher and lasted longer than that in NSI+CTL group ($P < 0.05$). There was significant difference among every two group, except control group and CYCI group ($P < 0.05$). **Conclusion** Tumor microenvironment in tumor-bearing mice could be effectively intervened by low-dose CYC administration in advance, with decreased Tregs, IL-10, and TGF- β levels. As a result, more transferred CTLs homing leads to the strengthened killing efficacy.

Key words: Adoptive cellular immunotherapy; Cytotoxic T lymphocytes; Tumor microenvironment; Immune escape

摘要: 目的 探讨应用低剂量环磷酰胺 (cyclophosphamide, CYC) 干扰荷瘤小鼠体内微环境对改善过继回输的细胞毒性T淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 瘤体内归巢和杀伤活性的作用。 **方法** 建立C57BL/6荷瘤小鼠模型并分为对照组、CYC注入 (CYCI) 组、0.9%NaCl溶液注入 (NSI) +CTL组和CYCI+CTL组, 每组40只, 分别给CYCI组、CYCI+CTL组每只小鼠腹腔注入CYC (20 mg/kg), NSI+CTL组小鼠注入等量0.9%NaCl溶液。检测注射前后不同时间小鼠瘤体内调节性T细胞 (Treg)、白细胞介素-10 (IL-10) 和转化生长因子- β (TGF- β) 水平变化。于注射后第4天回输CFSE-CTL, 每只0.2 ml, 含 5×10^6 个细胞。流式检测对比NSI+CTL组和CYCI+CTL组瘤体内CFSE-CTL比例。 **结果** NSI+CTL组小鼠Treg、IL-10、TGF- β 水平随着瘤体增长而逐渐增高; CYCI+CTL组比NSI+CTL组回输的CFSE-CTL在肿瘤内归巢明显增加和持久 ($P < 0.05$)。各组肿瘤体积除对照组和CYCI组外, 其余各组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 提前应用低剂量CYC干预荷瘤小鼠体内微环境, 可降低瘤体内Treg、IL-10和TGF- β 水平, 使过继回输的CTL在肿瘤中的归巢聚集明显增强, 杀伤肿瘤效率提高。

关键词: 过继性免疫治疗; 细胞毒性T淋巴细胞; 肿瘤微环境; 免疫逃逸

中图分类号: R73-36⁺2 **文献标识码:** A

收稿日期: 2013-11-15; 修回日期: 2014-04-30

基金项目: 河北省科技支撑计划项目 (10246139D); 国家自然科学基金 (81472503)

作者单位: 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院小儿外科

作者简介: 徐伟立 (1973-), 男, 博士, 副教授, 主要从事小儿肿瘤外科和肿瘤免疫治疗

0 引言

过继性免疫治疗是一种行之有效的肿瘤治疗方法, 但临床上常常会陷入困境, 原因和回输体内的效应细胞归巢存留时间短、杀伤效率低和肿瘤免疫耐受等有关^[1-2]。肿瘤微环境中高水平的调节性T细胞 (regulatory T cells, Treg)、白细胞介

素-10 (interleukin-10, IL-10) 和转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β) 被认为是诱导肿瘤免疫耐受的重要因素^[3]。如何有效下调这些免疫抑制因素, 改善效应细胞瘤体内存留分布和杀伤效率对于提高肿瘤免疫疗效十分重要。

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CYC) 是一种常用的细胞毒化疗药物, 同时也是一种免疫抑制剂。有研究证明^[4], 单次小剂量CYC在数量上及功能上都具有抑制Treg作用, 但不能延缓肿瘤生长。而有关CYC应用在降低Treg同时, 是否也能降低IL-10和TGF- β 等免疫抑制因子, 改善效应细胞体内分布和功能则未见报道。因此, 我们采用低剂量CYC腹腔注入对C57BL/6荷黑色素瘤小鼠体内微环境进行提前干预, 利用荧光染料2-羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (5, 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) 标记抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 回输小鼠体内, 以探讨应用低剂量CYC对瘤体内Treg、IL-10和TGF- β 影响以及对改善过继回输的CTL瘤体内归巢聚集和杀伤功能的重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和肿瘤细胞

恶性黑色素瘤细胞 (B16细胞) 株购自中国科学院上海细胞库。置于含10%灭活FBS、100 u/ml 青霉素和100 μ g/ml 链霉素的RPMI 1640培养液中, 于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂保湿培养箱中培养。健康C57BL/6小鼠均为雌性, 6~8周龄, 体重18~20g, 购自河北省实验动物中心[SPF级, 许可证编号: SYXK (冀) 2008-0026]。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤全抗原制备和负载于树突状细胞 (dendritic cell, DC) 收集对数生长期B16细胞, 调整浓度至 2×10^7 个/毫升, 快速冷冻至-80 $^{\circ}$ C, 于37 $^{\circ}$ C水浴复温, 循环4次, 10 000 r/min 离心15 min, 收集上清液, 于-80 $^{\circ}$ C冻存备用。颈椎脱位法处死小鼠, 无菌取股骨和胫骨。以RPMI 1640冲洗收集骨髓, 1 500 r/min离心5 min。弃上清液, 裂解红细胞, 细胞按 1×10^6 /ml浓度分至6孔培养板中, 加入rmGM-CSF (20 ng/ml)、rmIL-4 (20 ng/ml)。第6天按每毫升培养液加入120 μ g B16细胞裂解蛋白, 4 h后再加入rmTNF- α (15 ng/ml), 培养至第7天, 收集悬浮细胞即为负载肿瘤抗原的DC。

1.2.2 抗原特异性CTL制备 制备小鼠脾脏淋巴细

胞悬液, 依据Mouse CD3⁺ T Cell 磁珠分选试剂盒说明提取CD3⁺ T细胞, 培养2天后加入负载肿瘤抗原的DC (DC:T=1:20), 同时补充 rmIL-2 (20 ng/ml), 置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中混合培养3~4天, DC将所负载的肿瘤抗原信息提呈给T细胞, 使之激活并进一步扩增。

1.2.3 CFSE对CTL荧光标记和CD8⁺CTL检测

用一瓶50 μ g CellTrace™ CFSE溶于18 μ l DMSO中, 制备5 mmol/L CFSE贮存液。重悬CTL于37 $^{\circ}$ C预温的含5%胎牛血清的PBS, 细胞浓度 $\leq 50 \times 10^6$ /ml, 反应体系为1 ml。放平干燥的试管, 将110 μ l PBS加入试管头端干燥部分, 并将1.1 μ l 5 mmol/L的CFSE重悬其中, 使终浓度为5 μ mol/L。37 $^{\circ}$ C孵育10 min。加入5倍体积4 $^{\circ}$ C冷PBS, 终止染色。冰上孵育5 min。1 500 r/min离心沉淀细胞5 min。含5%胎牛血清的新鲜培养液洗2次。回输时用不含血清的培养液重悬细胞。流式细胞仪, 激发波长488 nm进行检测, 同时荧光显微镜观察。

将100 μ l染色后CTL重悬, 调整浓度为 1×10^7 个/毫升, 加1 ml新鲜破膜工作液, 暗处4 $^{\circ}$ C孵化30 min; 2 ml破膜缓冲液洗涤细胞, 2 500 r/min离心5 min, 弃上清液; 重复操作后, 加入0.5 μ g Fc受体封闭破膜缓冲液, 体积调整至100 μ l, 4 $^{\circ}$ C放置15 min; 加入0.5 μ g小鼠PE-Cy5-CD8⁺抗体, 暗处4 $^{\circ}$ C孵化30 min; 用2 ml破膜缓冲液洗涤细胞, 3 500 r/min离心5 min, 弃上清液; 重复后悬浮细胞, 流式细胞学检测CD8⁺CTL比例。

1.2.4 C57BL/6小鼠黑色素瘤模型建立和分组

取对数生长期B16细胞, 0.25%胰蛋白酶消化, 调整浓度至 5×10^5 /ml, 取瘤细胞悬液0.2 ml皮下接种于小鼠颈后区域, 7天后皮下可及直径约5 mm左右质硬黑色结节, 界限清楚, 视为建模成功。将模型鼠分为四组: CYC注入组 (CYC injection group, CYCI), 0.9%NaCl溶液注入+CTL回输组 (the solution of 0.9% w/v of NaCl injection plus CTL infusion group, NSI+CTL), CYC注入+CTL回输组 (CYC injection plus CTL infusion group, CYCI+CTL) 和对照组 (不实施任何治疗干预组)。分别于建模成功时对CYC组和CYCI+CTL组小鼠进行单次CYC腹腔注入 (20 mg/kg)^[4], 同时NSI+CTL组小鼠单次注入等体积的0.9%NaCl溶液。各组置无菌净化屏障系统内饲养, 每三日测量肿瘤结节最长径a和最短径b, 根据公式 $V=1/6\pi (ab^2)$ 计算体积, 绘制肿瘤生长曲线。

1.2.5 小鼠肿瘤内Treg、IL-10和TGF- β 水平检测

NSI+CTL和CYCI+CTL两组小鼠分别于CYC或0.9%NaCl溶液注射前(d0)和注射后d1、d4、d7、d11及d15各时间点脱颈处死,无菌收集2 mm³肿瘤组织加入预冷的0.9%NaCl溶液中,清洁表面血迹,加入组织裂解液50 μ l,放入含冰块烧杯,用细胞超生粉碎仪进行匀浆,直至充分裂解,10 000 r/min离心5 min后取上清液,分装并置于-20℃保存。按小鼠Treg流式检测试剂盒说明书对所收集细胞进行CD4 (FITC) CD25 (PE) foxp3 (PE-cy5) 三标染色后检测瘤体内Treg水平。ELISA法检测小鼠肿瘤分离上清液中TGF- β 和IL-10在注射前后水平变化,按试剂盒说明书方法进行。

1.2.6 回输CTL瘤体内归巢聚集检测 CYC或NSI注射后第4天,分别经以上两组小鼠鼠尾静脉回输培养的CFSE-CTL,每只0.2 ml,含 5×10^6 个细胞。分别于CTL回输后不同时间点(6 h、1 d、3 d、6 d、10 d、15 d、21 d)脱颈处死小鼠。解剖并称取1 g重不同时间肿瘤组织,清除脂肪组织后剪碎。置于200目不锈钢细胞筛上适度研磨,分离收集细胞。裂解红细胞,Hank's液洗涤2次,1 000 r/min离心5 min后弃上清液,RPMI 1640液重悬,调整浓度至 1×10^7 /ml。取单细胞悬液1 ml,与Hank's液1:1混匀,加入2 ml小鼠淋巴细胞分离液,1 500 r/min离心15 min,取淋巴细胞液层,洗涤2次,流式细胞仪,激发波长488 nm检测CFSE-CTL阳性细胞比例。红细胞、细胞碎片通过前向角光散射和对侧向角光散射分析设定门值排除。同时分别切取两组CTL回输后不同时间肿瘤组织迅速放置于OCT包埋剂中,制备15 μ m厚冰冻切片,激光共聚焦显微镜观测肿瘤组织内CFSE阳性细胞分布情况。

1.3 统计学方法

各组数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SAS (V8) 软件程序进行统计处理,采用 t 检验、

单因素方差分析和重复测量方差分析确定差异显著性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CFSE对CTL荧光标记和CD8⁺ CTL检测

利用CFSE对CTL标记后,荧光显微镜下观察,发现CFSE进入细胞后定位于细胞膜、细胞质和细胞核,在细胞核的荧光染色最强。倒置显微镜下对CTL进行对比观察,发现染色率几乎达100%,见图1A、1B。加入小鼠CD8⁺抗体,流式细胞学检测CD8⁺ CTL比例,达到41.7%,见图1C。

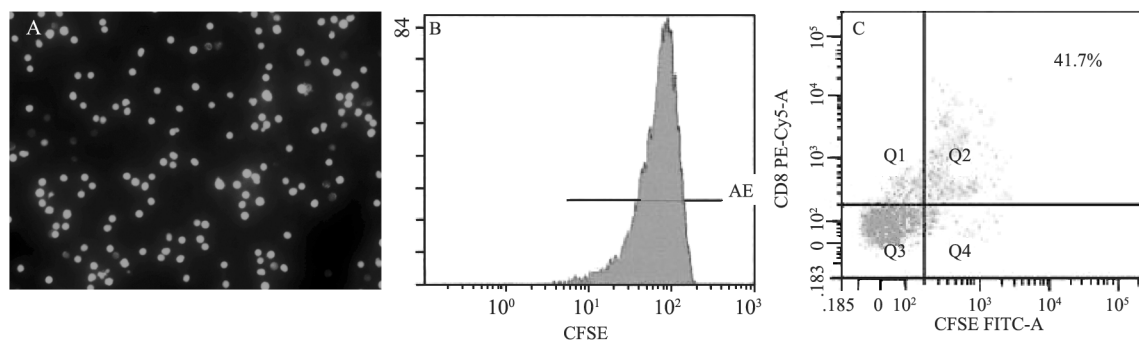
2.2 小鼠肿瘤内Treg、IL-10和TGF- β 水平比较

NSI+CTL组小鼠瘤体内Treg、IL-10和TGF- β 水平均随着肿瘤体积增长而逐渐增高;CYC+CTL组小鼠瘤体内Treg ($P=0.004$) 和IL-10 ($P=0.002$) 水平均于CYC注射后第4天显著降低,与对照组相比差异有统计学意义,见图2A、2B,以后逐渐提升;CYC组小鼠瘤体内TGF- β 水平则推迟至CYC注射后第7天时降低至最低水平,与对照组相比差异有统计学意义($P=0.003$),见图2B。

2.3 回输CTL在肿瘤内归巢聚集情况比较

CTL回输后6h~d1,两组均显示肿瘤组织中较多的CFSE-CTL聚集。d3~d15,两组间CTL分布模式出现差异:CYCI+CTL组肿瘤内表现为较多的CFSE-CTL聚集分布,且持续时间较长,达6~10天;而NSI+CTL组肿瘤组织,则表现为较少的CFSE-CTL分布聚集,持续时间短,3天之后迅速减少。d21,NSI+CTL组肿瘤组织中CFSE-CTL几乎消失;而CYCI+CTL组,肿瘤组织中仍可见到CFSE-CTL分布。统计分析显示肿瘤组织中CFSE-CTL阳性细胞比例在CYCI+CTL组比NSI+CTL组明显增多,且富集时间较长($P=0.009$),见图3A、3B。

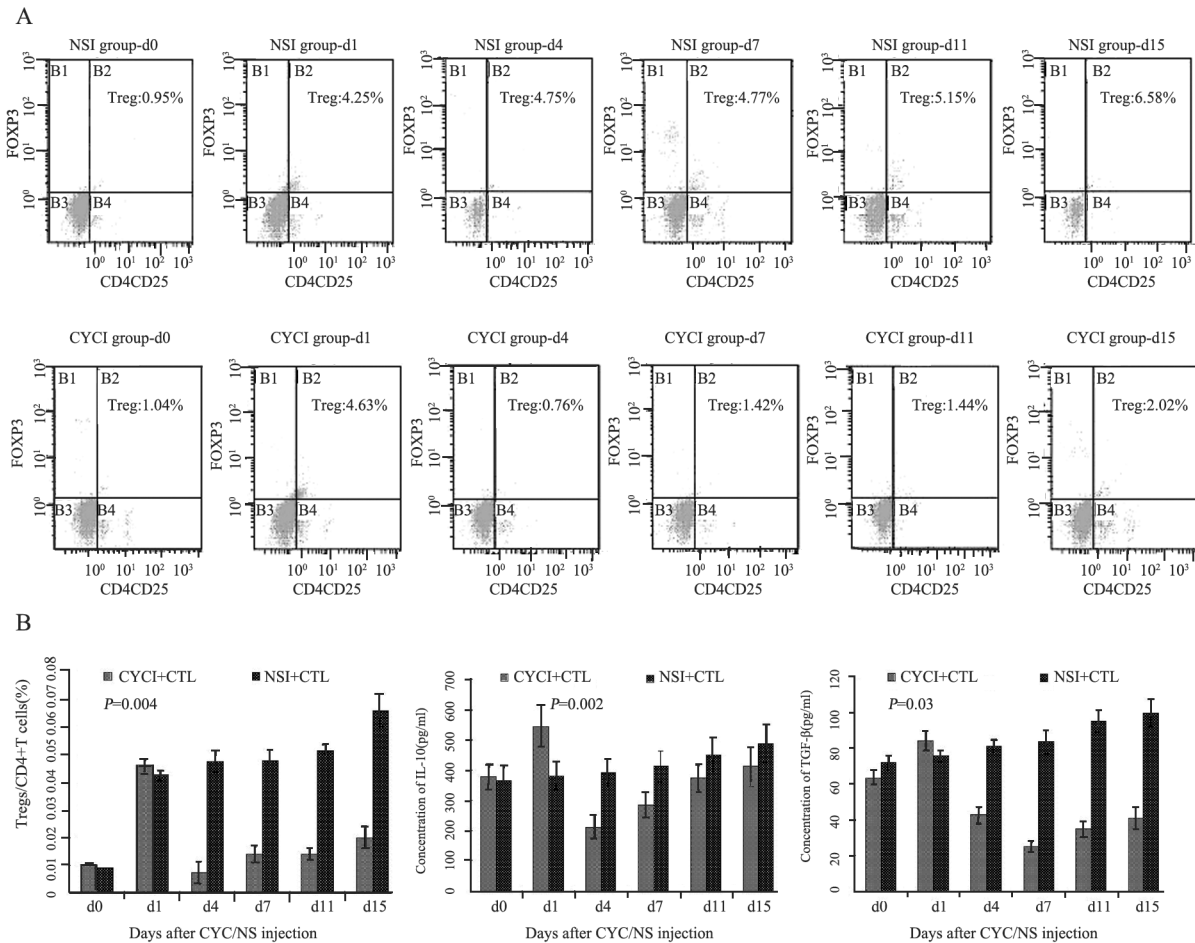
2.4 各组抗肿瘤效果比较



A: CTLs were labeled with CFSE at 5 μ mol/L ($\times 1000$); B: Fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry; C: The ratio of CD8⁺ CFSE-CTLs was analyzed by flow cytometry; CTLs: cytotoxic T lymphocyte; CFSE: 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

图1 CTLs荧光标记和流式细胞学分析

Figure1 Fluorescence labeling and flow cytometry analysis of CTLs



A: Flow cytometry charts of Tregs in tumors at the different time points after CYC or the solution of 0.9% w/v of NaCl injection between CYCI+CTL group and NSI+CTL group; B: Comparison of the levels of Treg, IL-10 and TGF-β in tumors at the different time points after CYC or NS injection between the two groups; CYC: cyclophosphamide; CYCI: cyclophosphamide injection; NSI: the solution of 0.9% w/v of NaCl

图2 CYCI+CTL和NSI+CTL两组CYC/0.9%NaCl溶液应用后各时间点Treg、IL-10、TGF-β水平比较

Figure2 Comparison of Treg, IL-10 and TGF-β levels at the different time points after CYC or the solution of 0.9% w/v of NaCl injection between CYCI+CTL group and NSI+CTL group

计算各组不同时间点肿瘤体积并进行比较。采用重复测量方差分析显示：CYCI组和对照组之间差异无统计学意义 ($P=0.648$)；其余各组之间差异均有统计学意义 ($P<0.05$)；NSI+CTL组和CYCI+CTL组相比，免疫治疗早期，两组间肿瘤体积差异无统计学意义 ($P>0.05$)，自回输后第3天始，两组间肿瘤体积差异均有统计学意义 ($P<0.001$)，肿瘤抑制效果差异自CTL回输后第6~15天尤为显著，见图4。

3 讨论

肿瘤微环境中复杂多变的免疫抑制网络限制了肿瘤过继性免疫治疗的实际效果，其中的免疫抑制因素是困扰免疫治疗的关键。近年来随着肿瘤免疫基础研究的发展，虽然仍未完整阐明肿瘤的免疫抑制网络，但其中重要节点-Treg细胞和细胞因子TGF-β、IL-10的作用日益受到重视^[5-6]。

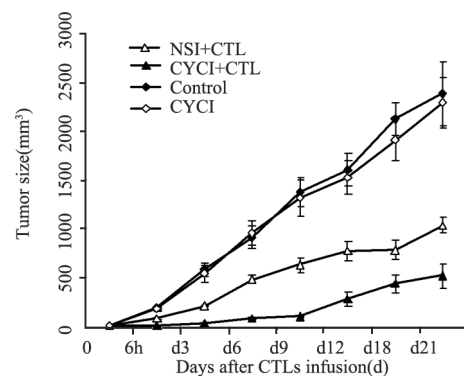
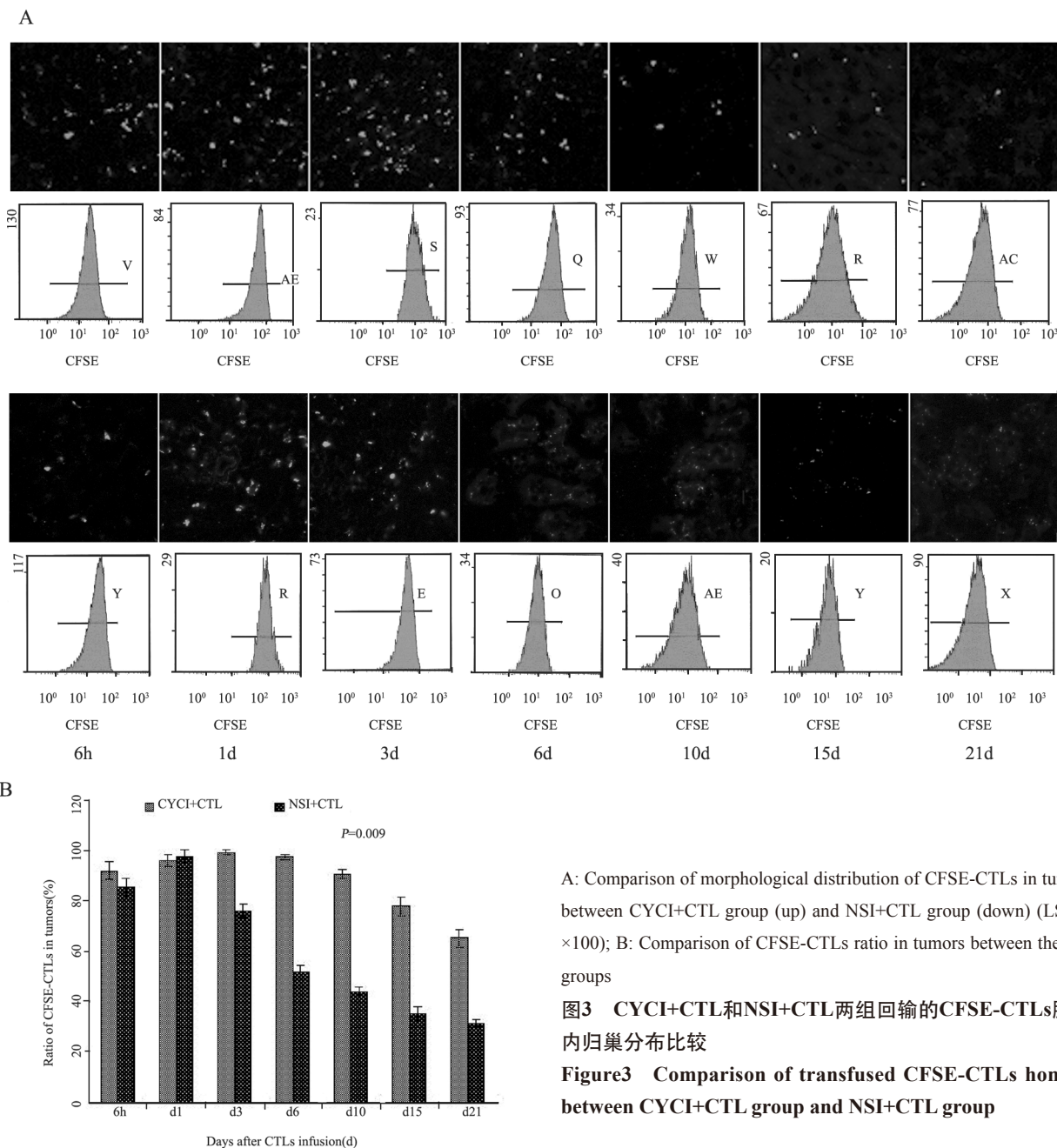


图4 CTLs回输后各组抗肿瘤效果比较

Figure4 Comparison of anti-tumor effect after CTLs infusion among every group

肿瘤微环境Treg比例增加，导致肿瘤免疫失调，去除这群细胞可有效诱导肿瘤免疫^[5]。动物实验表明，肿瘤微环境中激活的TGF-β诱导的免疫抑制是保护肿瘤细胞逃脱机体免疫系统监视的最



A: Comparison of morphological distribution of CFSE-CTLs in tumors between CYCI+CTL group (up) and NSI+CTL group (down) (LSCM $\times 100$); B: Comparison of CFSE-CTLs ratio in tumors between the two groups

图3 CYCI+CTL和NSI+CTL两组回输的CFSE-CTLs肿瘤内归巢分布比较

Figure3 Comparison of transfused CFSE-CTLs homing between CYCI+CTL group and NSI+CTL group

重要因素，TGF- β 是肿瘤免疫逃逸的最主要调控者^[7]。而当机体发生肿瘤时，IL-10水平会异常升高。Treg可通过分泌TGF- β 、IL-10等因子抑制效应T细胞和DC功能^[8]。TGF- β 可诱导Treg扩增，而扩增的Treg又可进一步分泌TGF- β ^[8]。可见，Treg、TGF- β 和IL-10在肿瘤微环境中相互影响和作用，诱导了肿瘤的免疫耐受。而寻找消除这些免疫抑制因素的新方法，成为肿瘤免疫治疗领域研究的重要课题。

已有报道低剂量CYC能降低和抑制正常小鼠Treg细胞数目和功能，其机制可能是通过抑制Treg增殖并且增强其凋亡敏感度而实现的^[9]。因为Treg、TGF- β 和IL-10这三种免疫抑制因素的密

切关联作用，低剂量CYC有可能抑制Treg同时，对肿瘤微环境中的TGF- β 和IL-10水平也会产生影响，从而有可能打破肿瘤免疫耐受，调控效应细胞在瘤体内的存留分布和功能效应。本实验中利用低剂量CYC腹腔注射，发现在降低荷瘤小鼠体内Treg同时，TGF- β 和IL-10水平也同时下降。分析其原因，可能是小剂量CYC引致体内Treg水平下降，后者会导致TGF- β 、IL-10的分泌下降，另一方面，Treg水平下降又会破坏肿瘤免疫抑制，引致肿瘤产生IL-10下降；而IL-10下降又能导致无能T细胞产生TGF- β 下降。因此出现Treg、IL-10和TGF- β 水平的同时下降，从而破坏了肿瘤免疫耐受，以利于回输的CTL充分发挥其杀伤效应。进

一步研究发现, Treg和IL-10在注射后第4天降低最明显, 而TGF- β 则较为延迟, 于用药后第7天降低较明显, 这就提示低剂量CYC提前应用提供了免疫治疗的最佳“窗口期”, 即CYC干扰微环境后4~7天实施CTL回输治疗, 治疗效果应当最佳。

过继免疫治疗细胞经外周静脉途径输注后在活体内分布迁徙规律的研究, 目前主要集中在细胞可以分布的器官、可否归巢于淋巴循环以及是否对肿瘤组织选择性富集^[10]。本研究发现, CYC干扰微环境组较对照组回输的CTL在肿瘤组织中归巢聚集明显且存留时间长, 低剂量CYC可以明显改善效应细胞在肿瘤内的存留分布。

但是实验中发现单纯的低剂量CYC应用并不能产生明显地抑瘤作用, 还需要抗原特异性效应细胞CTL的回输才能发挥有效作用。在利用低剂量CYC干扰肿瘤免疫微环境, 摆脱免疫耐受的基础上, 回输的CTL对肿瘤的杀伤效率才得以明显提高, 肿瘤体积生长明显减缓, 这种趋势愈近治疗后期愈明显。当然, CTL回输体内后对肿瘤的杀伤作用十分复杂, 诸如各种杀伤介质的蛋白表达水平变化, 肿瘤细胞的凋亡坏死等, 因此其具体机制还需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Kaluza KM, Vile R. Improving the outcome of adoptive cell transfer by targeting tumor escape[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(1): e22059.
- [2] Bellone M, Calcinotto A, Filipazzi P, *et al.* The acidity of the tumor microenvironment is a mechanism of immune escape that can be overcome by proton pump inhibitors[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(1): e22058.
- [3] Song Y, Zhu XK. Current progress of the mechanism of tumor immune escape[J]. *Xian Dai Zhong Liu Yi Xue*, 2011, 19 (6): 1230-4. [宋彦, 朱喜科. 肿瘤免疫逃逸机制的研究新进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(6): 1230-4.]
- [4] Sharabi A, Haran-Ghera N. Immune recovery after cyclophosphamide treatment in multiple myeloma: implication for maintenance immunotherapy[J]. *Bone Marrow Res*, 2011, 2011: 269519.
- [5] Singer BD, King LS, D'Alessio FR. Regulatory T cells as immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 46.
- [6] Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, *et al.* Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor- β decreases the percentages of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival[J]. *Surgery*, 2012, 151(2): 313-22.
- [7] Perrot CY, Javelaud D, Mauviel A. Insights into the transforming growth factor- β signaling pathway in cutaneous melanoma[J]. *Ann Dermatol*, 2013, 25(2): 135-44.
- [8] Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression[J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(2): 186-204.
- [9] Heylmann D, Bauer M, Becker H, *et al.* Human CD4+CD25+ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83384.
- [10] Wu ZY, Du XH, Xu YX, *et al.* Evaluation of in vivo labeled cytotoxic T lymphocytes and cytokine-induced killer cells migration and distribution of subcutaneous gastric tumor model in nude mice[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2010, 90(6): 403-6. [武增瀛, 杜晓辉, 徐迎新, 等. 细胞毒性T淋巴细胞和细胞因子诱导杀伤细胞在荷人胃癌裸鼠体内的迁徙与分布[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(6): 403-6.]

[编辑校对: 黄园玲]